Aus der allgemeinen Universitäts-Poliklinik, Basel
Direktor: Prof. Dr. F. Egger.

Einfluss der Nahrung auf die Vitalfärbung.

(EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen medizinischen Fakultät

der

Universität Basel

vorgelegt von

Michail Martinovitch

aus **Nikchitch** (Montenegro)

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Buchdruckerei C. J. Bucher A.-G., Luzern

1917

Von der medizinischen Fakultät Basel
genehmigt auf Antrag von
Herrn Prof. Dr. F. EGGER

Es ist mir angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. F. EGGER und besonders Herrn Privat-Dozent Dr. ALFRED GIGON für die Anregung zu dieser Arbeit, sowie für die Ratschläge und Unterstützung während derselben, meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Obschon von *Ehrlich*, *Bouffard*, *Ribbert*, *Schlecht*, u. a. Arbeiten über Vitalfärbungen veröffentlicht wurden, hat erst *Goldmann* durch ausgedehnte Untersuchungen diese neue Methodik auf breiter Basis ausgebaut.

Das Wort Vitalfärbung hat *Ehrlich* gewählt, um damit anzuzeigen, dass eine lebende Zelle durch ein Farbstoff gefärbt wird und dadurch von andern Zellen, die den Farbstoff nicht aufnehmen, ausgezeichnet wird. *Ehrlich* arbeitete mit Methylenblau.

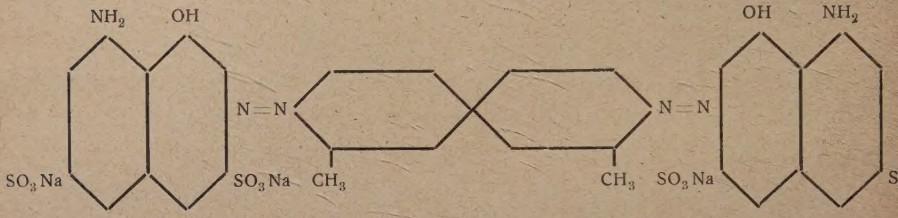
Bouffard hat hauptsächlich Trypanblau gebraucht. *Ribbert* und *Schlecht* verwendeten als Vitalfarbstoff Carmin und versuchten damit Einblick in die Tätigkeit der Nierenepithelien zu gewinnen. *Ribbert* fand Einlagerungen des Carmins in den Harnkanälchenepithelien, niemals aber in den Glomerulis. Auch in den Leberzellen wurde von ihm reichlich Carmin gefunden, die Leber scheidet aber den Farbstoff nicht aus, in den Gallengängen und in der Galle konnte *Ribbert* niemals Carmin finden. In den Leberzellen trat Carmin zeitlich später auf als in den Nieren, oft erst nach mehrmaliger Injektion. Die Ausscheidung des intraperitoneal wie die des intravenös injizierten Carmins erfolgt durch die Niere. Darmepithelien und Darminhalt waren frei von Farbstoff. Bei Schädigung der Nieren, z. B. bei Phosphornephritis findet die Ausscheidung des Farbstoffes nicht nur durch die Tubuli contorti, sondern auch durch die Glomeruli statt.

Carmin als Vitalfarbstoff hat grosse Nachteile. Die Injektionen werden schlecht vertragen und der Farbstoff wird sehr rasch ausgeschieden.

Goldmann arbeitete mit Pyrrolblau, Isaminblau, Trypanblau und Trypanrot. Er hat hauptsächlich das Isaminblau verwendet. *Schulemann*, dem wir die ausgedehntesten Untersuchungen über die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften der Vitalfarbstoffe verdanken, stellte fest, dass das Pyrrolblau

Goldmanns mit dem Isaminblau 6B indentisch ist. Das Isaminblau wird von den Kaninchen schlecht vertragen. Intravenös injiziert erzeugt es tödliche Embolien, auch bei der wiederholten subcutanen Injektion geht das Tier rasch zu Grunde. Trypanblau wird dagegen von Kaninchen sowohl intravenös wie auch subcutan sehr leicht vertragen. Es wird von *Schulemann* als der geeigneteste Farbstoff empfohlen.

Das Trypanblau ist ein blauer Farbstoff aus der Reihe der Benzidinfarbstoffe. Seine Formel ist folgende:



Es ist also ein Natronsalz einer Farbsäure, besitzt aber noch sauren Charakter. Das Trypanblau ist leicht wasserlöslich, nicht aber in absolutem Alkohol, Aether, Chloroform, Benzol und Oel.

Schulemann gelangte zu dem wichtigen Schlusse, dass das physiko-chemische Verhalten der Farbstofflösungen für die Verteilung der Farbstoffe im Tierkörper massgebend ist. Diejenigen Farbstoffe, die am schnellsten diffundieren, sind diejenigen, welche sich wie Elektrolyten verhalten.

„Je kleiner ein Farbstoffmolekül ist, je mehr es seine Konstitution zur Dialyse befähigt, je weniger der Farbstoff zur Molekülaggregatbildung neigt, je weniger sinkende Temperatur, zunehmendes Alter, steigende Konzentration, vermehrter Zusatz von Fremdelektrolyten die Dissoziation zurückdrängen und die Assoziation zu fördern vermögen, um so schneller wird ein Farbstoff diffundieren, um so schneller auch diffus die tierischen Gewebe durchtränken, um so schneller auch wird er vom Tier wieder ausgeschieden." (*Schulemann*, Vitale Färbungen mit sauren Farbstoffen, biochemische Zeitschrift 80, 1917, S. 1029.) Farbstofflösungen, welche dagegen den Charakter einer Kolloidlösung zeigen, bleiben an der Injektionsstelle im Tierkörper liegen.

Was die Speicherung der Farbstoffe in den vitalfärbbaren Zellen anbelangt, so haben die Untersuchungen von *Schulemann* keine eindeutigen Resultate gegeben. Zweifellos ist es, dass zum Studium in dieser Eigenschaft saure Farbstoffe sich am besten eignen. Hier sei erwähnt, dass nach *Schulemanns* Untersuchungen von ein und derselben Zellkategorie aufgenommen wurden:

1. Säurefarbstoffe in jedem Lösungszustand
2. Metallkolloide
3. Tuberkelbazillen
4. Erythrocyten und polymorphkernige Leukocyten
5. Chinesische Tusche
6. Gallenfarbstoffe
7. Cholesterin.

Ferner hat *Goldmann* darauf hingewiesen, dass Glykogen und Fett in ihrer Verteilung im Organismus gewisse Beziehungen zur Vitalfärbung zeigen. Z. B. der vitale Farbstoff gelangt zum graviden Uterus wie das Glykogen auf dem Wege der Blutbahn um „genau an jenen Stellen in die Erscheinung zu treten, wo wir auch das Glykogen angetroffen haben". (*Goldmann*, Über vitale Färbung, Bruns Beiträge zur klinischen Chirurgie 78, 1912 S. 25.) Diese Untersuchungen ergeben, dass die Ablagerung der sauren Farbstoffe der Verteilung von Stoffwechselprodukten im Organismus parallel geht.

Durch zweckmässige Versuchsanordnungen scheint es demnach möglich zu sein, mit Hilfe der Vitalfärbung neue Einblicke über den Eiweiss- und Fettstoffwechsel und über die Glykogenbildung zu gewinnen. Anderseits ist es sicher, dass durch die Wahl der Fütterung beim Tiere die Stoffwechselvorgänge beeinflusst werden; allerdings sind wir über die Art dieser Beeinflussung noch nicht unterrichtet. Es erschien uns daher von Interesse, Versuche anzustellen zur Prüfung, ob die Organe bei der Vitalfärbung verschiedene makroskopische und mikroskopische Bilder aufweisen, je nach dem Modus der Fütterung. Dies ist die eine Aufgabe, die wir uns gestellt haben. Eine zweite Aufgabe war die, ob die Phloridzinvergiftung die Vitalfärbung zu beeinflussen im Stande ist. Bekanntlich wird das Phloridzin als Nierengift betrachtet; es ist aber nicht ausgeschlossen, dass es auch die Lebertätigkeit wesentlich beeinflusst. Wir hofften durch die kombinierte Wirkung des Phloridzins und des Trypanblau

Aufschluss zu bekommen über die Tätigkeit der Nieren und Leber bei der Phloridzinglycosurie. Derartige Untersuchungen haben wir in der Literatur nicht gefunden.

Versuchsanordnung.

Als Versuchstiere werden Kaninchen gewählt. Dieselben erhielten als Futter entweder Kleie oder Rüben. Nur zwei Tiere bekamen als Futter Heu. Nachdem sie mindestens 8 Tage ausschliesslich eines dieser Futtermittel bekamen, wurde mit der Injektion des Vitalfarbstoffes begonnen. Als solcher wählten wir das Trypanblau und zwar in 0,5 und 1 % Lösung in destiliertem Wasser. Trypanblau in Ringerlösung wird von Kaninchen schlecht vertragen. Die Lösung wurde intraperitoneal, intravenös und subcutan in verschieden grossen Dosen und verschieden lange Zeit hindurch injiziert. Die Lösung wurde nicht gewärmt. Für die intravenösen Injektionen müssen frische Lösungen verwendet werden, alte Lösungen scheinen sich zu verändern; es entsteht in derselben ein Farbstoffniederschlag, der schädigend auf das Tier wirkt.

Wir haben Trypanblau vorgezogen: 1. wegen seiner Ungiftigkeit, 2. weil es ausserordentlich leicht im Tierkörper diffundiert, 3. weil es die haltbarsten und schönsten mikroskopischen Präparate liefert und schliesslich 4. hatten wir den Vorteil, unsere Resultate mit denjenigen von *Goldmann* und *Schulemann* leichter vergleichen zu können, da diese beiden Autoren ebenfalls diesen sauren Farbstoff zu ihren Untersuchungen verwendeten.

Unsere sämtlichen Tiere — mit Ausnahme von zwei — waren, bis sie getötet wurden, gesund. Irgend eine Störung des Befindens liess sich nicht erkennen. Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde täglich kontrolliert. Merkliche Schwankungen konnten wir niemals konstatieren. Bei allen Tieren wurde der Harn täglich untersucht und zeigte keine abnormalen Bestandteile. Nur bei einem Tiere trat gleich am Anfang des Versuches Eiweiss im Urin auf. Es wurden dann die Injektionen für vier Tage ausgesetzt und dann wieder aufgenommen. Harn war eiweissfrei. Bei den Phloridzintieren trat Zucker gleich nach der ersten Injektion im Harn auf und wurde beständig ausgeschieden.

Wir führten die Versuche immer so lange weiter, bis im Harn Farbstoff erschien. Dabei muss betont werden, dass der

Farbstoff im Harn des Kaninchens nicht immer leicht sichtbar ist. Er lässt sich am besten bei minimalen Quantitäten durch Filtrieren nachweisen. Wird Trypanblau ausgeschieden, so wird das Filtrierpapier mehr oder weniger stark blau gefärbt.

Wir hatten die Absicht, diese Untersuchungen weiter auszudehnen; leider wurden wir durch die Kriegsverhältnisse (Fehlen an Tieren und Futtermaterial) daran verhindert.

Nachdem bei jedem Tiere der Farbstoff im Urin erschienen war, wurde das Tier nach Morphiuminjektion durch Injektion einer 10 % Formalinlösung in das schlagende Herz getötet und so zugleich die Organe gehärtet. Die Organe wurden dann einige Stunden nach dem Tode herausgenommen und in 10 % Formalinlösung aufbewahrt. Darin geht das Trypanblau nicht in Lösung.

Versuch No. I.

Männlich. Anfangsgewicht 2330 gr., Schlussgewicht 2300 gr., Rübenfütterung. Eine 0,5 % Lösung des Farbstoffes wurde subcutan injiziert. Vom 6. XI. bis 12. XII. bekam das Tier 100 ccm. Die Färbung der Ohren, Lippen, Zunge und Conjunctiven erschien, nachdem das Tier 60 ccm injiziert bekam. Am gleichen Tage wurde auch der Harn zum ersten Male leicht gefärbt. Harnmenge täglich ca. 300 ccm.

Die Autopsie ergab folgendes:

Haut deutlich blau gefärbt mit Intensitätunterschieden an verschiedenen Partien. Am meisten waren gefärbt die Ohren und die Rückenhaut. (Die Injektion geschah am Rücken.) In der Bauchhöhle etwa 10 ccm. eines hellblauen Exudates. Die übrigen Leibeshöhlen frei von Erguss. Muskulatur nicht gefärbt. Die Fascien und die Subcutis deutlich blau gefärbt. Conjunctiva, Zunge und Lippen intensiv blau. Trachealschleimhaut wenig, die Lunge und Pleura gar nicht gefärbt. Herzmuskel und Endokard nicht gefärbt. Peritoneum blau. Magenschleimhaut gefärbt; am intensivsten in der Pylorusgegend, Fundus auffallend wenig gefärbt. Die Magenwand in ihrer ganzen Dicke blau, doch am intensivsten die Mucosa. Der Darm, sowohl Dick- wie Dünndarm in ihrer ganzen Länge gefärbt. Auch hier das gleiche Verhältnis wie bei Magen, die Schleimhaut stärker als die übrigen Schichten, vielleicht Dickdarmschleimhaut etwas stärker als bei Dünndarm. Milz leicht

gefärbt. Auf Schnitt leichte Färbung, die scheinbar der Pulpa angehört. Pancreas ganz wenig gefärbt. Die Leberkapsel tiefblau. Auf Schnitt zeigt das ganze Organ eine diffuse gleichmässig blaue Färbung. Die Gallenblase deutlich tingiert, die Galle stark blau gefärbt. Die intensivste Färbung weist die Niere auf. Bei beiden Nieren ist die Kapsel und das Nierenbecken intensiv gefärbt. Auf Schnitt findet sich wie bei *Goldmanns* Versuchen eine grosse Differenz zwischen der tiefblau gefärbten Rinde und dem fast ungefärbten Mark. Ureter und Blasenschleimhaut hellblau gefärbt. Die Nebenniere ist ebenfalls blau tingiert, jedoch bedeutend weniger als die Niere. Auch hier besteht eine Farbdifferenz, indem die Rindesubstanz blauer ist als das Mark. Thymus beinahe farblos. Venen und Arterien sind deutlich gefärbt. Bei der Aorta war die Intima stärker tingiert als die übrigen Membranen. Das Blut ist vollkommen frei von Farbstoff. Die Hoden sind wenig gefärbt. Die Hirnsubstanz ganz weiss. Die Hypophyse nicht gefärbt. Cerebrospinalflüssigkeit vollkommen wasserklar. Knochenmark gefärbt. Der Kot zeigt keine Spur von blauem Farbstoff, desgleichen Mageninhalt.

Versuch No. II.

Weiblich. Anfangsgewicht 2650 gr., Schlussgewicht 2400 gr., Fütterung mit Rüben. Injektion subcutan. Von einer 0,5 % Lösung wurde im Ganzen 110 ccm. vom 19. XI. bis 26. XII. injiziert.

Urin erschien gefärbt, nachdem das Tier 70 ccm injiziert bekam. Zu gleicher Zeit zeigten die Ohren, Lippen, Zunge und Conjunctiven leichte blaue Färbung. Die Harnmenge war täglich ca. 350 ccm.

Bei der Sektion ist die Leber etwas stärker gefärbt als bei I., die andern Organe wie bei I. Der Uterus und die Ovarien mässig gefärbt.

Versuch No. III.

Männlich. Anfangsgewicht 2250 gr., Schlussgewicht 2230 gr., Fütterung mit Kleie. Vom 16. XI. bis 11. XII. wurden von einer 0,5 % Lösung 60 ccm. subcutan injiziert. Nach Injektion von 40 ccm. erschien der Harn gefärbt und erst allmählich wurden die Ohren, Lippen, Zunge und Conjunctiven blau. Urinmenge täglich ca. 100 ccm.

Bei der Autopsie war folgendes zu sehen:

Die Haut mit Intensitätunterschieden tief blau gefärbt. Die Leibeshöhlen frei von Erguss. Die Körpermuskulatur nicht gefärbt, die Lendenmuskulatur spurweise. Conjunctiven, Zunge, Lippen intensiv blau, Trachealschleimhaut, Lunge und Pleura gar nicht gefärbt. Herzmuskel und Endokard etwas gefärbt. Peritoneum sehr stark gefärbt. Magenschleimhaut besonders in der Pylorusgegend stark gefärbt. Magenwand in ihrer ganzen Dicke gefärbt. Der ganze Darmtractus in allen seinen Schichten gefärbt. Milz gefärbt. Auf Schnitt Pulpa gefärbt, die Follikel nicht. Pancreas nicht gefärbt. Die Leberkapsel intensiv blau. Auf Schnitt zeigt sich eine ausserordentlich starke diffuse Färbung des ganzen Organs. Die Gallenblase und die Galle stark gefärbt. Nebenniere gefärbt. Auf Schnitt ist die Rinde bedeutend stärker gefärbt als das Mark. Von allen Organen zeigt die Niere die intensivste Färbung. Auf Schnitt ist die Rinde ausserordentlich stark gefärbt, das Mark fast gar nicht und dann wieder das Nierenbecken sehr stark gefärbt. Ureter und Blasenschleimhaut stark gefärbt. Thymus ist farblos. Die Arterien und Venen sind deutlich blau tingiert. Das Blut ist vollständig frei von Farbstoff. Die Hoden sind gefärbt. Plexus chorioideus deutlich gefärbt, die Hirnsubstanz und die Hypophyse nicht gefärbt. Cerebrospinalflüssigkeit ist wasserklar. Das Knochenmark ist gefärbt. Kot war frei von Farbstoff.

Versuch No. IV.

Männlich. Anfangsgewicht 2900 gr., Schlussgewicht 3000 gr., Fütterung mit Kleie. Die Lösung (0,5 %) wurde subcutan, 75 ccm. vom 2. I. bis 8. II. injiziert. Urin blau nach Injektion von 40 ccm., gleichzeitig die Ohren, Zunge, Lippen und die Conjunctiven. Urinmenge ca. 150 ccm. täglich.

Bei der Sektion zeigten die Organe dasselbe Bild wie bei III.

Während der ersten Tage des Versuches trat im Urin Eiweiss auf. Die Injektion wurde dann vier Tage ausgesetzt und dann wieder zuerst mit ganz kleinen Dosen beginnend fortgesetzt. Urin war beständig eiweissfrei.

Versuch No. V.

Männlich. Anfangsgewicht 2230 gr., Schlussgewicht 2230 gr., Fütterung mit Rüben. Injektion von einer 0,5 % Lösung 40 ccm.,

vom 5. XII. bis 8. I. intraperitoneal. Urin blau nach Injektion von 30 ccm., gleichzeitig Ohren, Zunge, Lippen und Conjunctiven. Urinmenge ca. 250 ccm. täglich.

Bei der Sektion die Organe wie bei I. Nur zeigte die Leber nicht so starke Färbung. Die Lungen spurweise gefärbt.

In der Bauchhöhle etwa 20 ccm. eines deutlich gefärbten Exudats.

Versuch No. VI.

Weiblich. Anfangsgewicht 2500 gr., Schlussgewicht 2400 gr., Fütterung mit Kleie. Von einer 0,5 % Lösung wurden vom 9. I. bis 5. II. 40 ccm. intraperitoneal injiziert. Urin blau nach Injektion von 30 ccm., gleichzeitig die Ohren, Zunge, Lippen und die Conjunctiven. Urinmenge ca. 100 ccm täglich.

Die Organe bei der Sektion wie bei III.

Versuch No. VII.

Weiblich. Anfangsgewicht 1850 gr., Schlussgewicht 1850 gr., Fütterung mit Rüben. Injektion von einer 0,5 % Lösung in fünf Tagen 10 ccm. (täglich 2 ccm.) intravenös (in die Ohrvene) und dann in drei folgenden Tagen (täglich 10 ccm.) 30 ccm., im ganzen 40 ccm.

Urin blau nach Injektion von 10 ccm., gleichzeitig die Ohren, Zunge, Lippen und die Conjunctiven. Urinmenge ca. 250 ccm. täglich.

Bei der Sektion ergab sich dasselbe Bild wie bei I. nur Myokard war etwas gefärbt.

Versuch No. VIII.

Männlich. Anfangsgewicht 2600 gr., Schlussgewicht 2550 gr., Fütterung mit Rüben. Von einer 1 % Lösung wurden in vier Tagen 80 ccm. (täglich 20 ccm.) intravenös (in die Ohrvene) injiziert. Nach der ersten Injektion war das Tier tief blau gefärbt. Die Ohren, Zunge, Lippen und Conjunctiven wurden tief blau. Urin intensiv blau nach der ersten Injektion. Urinmenge ca. 200 ccm. täglich.

Bei der Sektion waren alle Organe mit Ausnahme der Lunge tief blau gefärbt. Auch hier natürlich die Niere und die Leber am stärksten. Die anderen Organe wie bei I. nur viel stärker. Es fiel besonders starke Färbung des Myokards und des Knochen-

markes auf. Die Gallenblase war vergrössert und wie auch die Galle sehr stark gefärbt. Die Blutgefässe zeigten eine sehr ausgeprägte blaue Färbung, das Blut war aber vollständig farbstofffrei. Der Darminhalt gefärbt.

Versuch No. IX.

Weiblich. Anfangsgewicht 1300 gr., Schlussgewicht 1250 gr., Fütterung mit Kleie. Injektion einer 0,5 % Lösung intravenös, zuerst mit kleineren Dosen angefangen und dann mit grösseren fortgesetzt. Nach Injektion von 20 ccm. ging das Tier zu Grunde. Urin blau nach Injektion von 10 ccm., gleichzeitig die Ohren, Zunge, Lippen und Conjunctiven. Urinmenge ca. 80 ccm. täglich.

Bei der Sektion die Organe wie bei III. nur vielleicht nicht ganz so stark.

Versuch No. X.

Männlich. Anfangsgewicht 2400 gr., Schlussgewicht 2350 gr., Fütterung mit Kleie. Injektion von einer 0,5 % Lösung 60 ccm. in vier Tagen (15 ccm. täglich) intravenös. Urin blau nach der ersten Injektion, gleichzeitig die Ohren, Zunge, Lippen und die Conjunctiven. Die Urinmenge war sehr klein, im ganzen löste das Tier während der vier Versuchstage etwa 100 ccm. Bei der Sektion die Organe wie bei III. nur etwas mehr gefärbt.

Versuch No. XI.

Männlich. Anfangsgewicht 2250 gr., Schlussgewicht 2250 gr., Fütterung mit Kleie. In vier Tagen (täglich 20 ccm.) wurden 80 ccm. von einer 1 % Lösung intravenös injiziert. Urin blau nach der ersten Injektion und gleichzeitig die Ohren, Lippen, Zunge und die Conjunctiven. Harnmenge ca. 80 ccm. täglich.

Bei der Sektion die Organe wie bei III. nur stärker, etwa so stark wie bei VIII. Myokard sehr stark gefärbt.

Versuch No. XII.

Weiblich. Anfangsgewicht 1700 gr., Schlussgewicht 1700 gr., Fütterung mit Heu, als Kontrolltier zu Phloridzintier No. XIII. Es wurden intravenös 15 ccm. einer 1 % Trypanblaulösung in drei Tagen (5 ccm. täglich) injiziert. Harn blau nach der ersten Injektion. Die Harnmenge ca. 100 ccm. täglich.

Versuch No. XIII.

Männlich. Anfangsgewicht 1500 gr., Schlussgewicht 1450 gr. Fütterung mit Heu. Das Tier wurde mit Phloridzin behandelt und erhielt 15 gr. Gleichzeitig wurden ihm in die Ohrvene (täglich 5 ccm.) 15 ccm. von einer 1 % Trypanblaulösung injiziert. Der Harn zeigte nur Spuren einer Färbung. Die Harnmenge ca. 100 ccm. täglich.

Die beiden Tiere wurden zu gleicher Zeit getötet und die Organe verglichen. Es ergab sich folgendes:

Bauchhaut gleich intensiv, die Ohren beim Kontrolltier etwas dunkler, die Conjunctiven ohne Unterschied. Bei beiden Tieren im Peritoneum etwas deutlich gefärbte Flüssigkeit. Thymus beinahe farblos. Myokard ohne Unterschied, sehr wenig gefärbt. Die Trachea beim Kontrolltiere etwas dunkler, die Lungen überhaupt nicht gefärbt. Die Milz etwas gefärbt, ohne Unterschied, wie auch die Nebenniere. Der grösste Unterschied war bei der Niere und Leber zu sehen. Die Nierenrinde war deutlich weniger gefärbt beim Phloridzintiere. Auch die Leber zeigte denselben Befund, nämlich war weniger beim Phloridzintiere gefärbt. Magendarmtractus gefärbt, ohne Unterschied. Pancreas minimal gefärbt, ohne Unterschied. Die Geschlechtsorgane gefärbt, ohne Unterschied. Plexus chorioideus deutlich gefärbt. Hirnsubstanz und die Hypophyse nicht gefärbt. Cerebrospinalflüssigkeit wasserklar.

Versuch No. XIV.

Weiblich. Anfangsgewicht 2250 gr., Schlussgewicht 2250 gr, Fütterung mit Kleie. Kontrolltier zu Phloridzintier Nr. XV. Von einer 1 % Trypanblaulösung wurde in sechs Tagen (täglich 10 ccm.) 60 ccm. intravenös injiziert. Urin blau nach der ersten Injektion. Urinmenge ca. 150 ccm. täglich.

Versuch No. XV.

Weiblich. Anfangsgewicht 2200 gr., Schlussgewicht 2200 gr., Fütterung mit Kleie. Es wurden subcutan 2 gr. Phloridzin und gleichzeitig, wie bei XIV, 60 ccm. 1 % Trypanblaulösung injiziert. Urin etwas gefärbt nach der ersten Injektion. Am letzten Versuchstage war der Harn des Phloridzintieres noch bedeutend weniger gefärbt als derjenige des Kontrolltieres. Die beiden Tiere

wurden gleichzeitig getötet und die Organe verglichen. Es fand sich makroskopisch wie bei XII. und XIII. nur ein Farbenunterschied bei der Niere und Leber, die beim Phloridzintiere weniger stark gefärbt waren als beim Kontrolltiere.

In unseren Protokollen haben wir mikroskopische Untersuchungen bei Seite gelassen. Wir werden uns in Folgendem auch ausschliesslich auf die makroskopischen Befunde beschränken. Die letzteren zeigen einige interessante Resultate, die uns mitteilenswert erschienen. Die mikroskopischen Untersuchungen sind im Gange und werden im hiesigen pathologischen Institute bearbeitet. Wir haben selbst bei den meisten unserer Versuchstiere Schnitte von der Niere, Leber und Darm gemacht und werden später kurz darüber berichten.

Besprechung der Resultate.

Wenn wir zuerst die gemeinsamen Erscheinungen besprechen, die wir bei unseren sämtlichen Versuchstieren beobachten konnten, so möchten wir dieselben wie folgt zusammenfassen:

Bei allen Tieren war unabhängig von dem Injektionsmodus und von der Nahrung eine mehr oder weniger intensive Färbung der Schleimhaut des gesamten Verdauungstractus (Lippen, Mundschleimhaut, Zunge, Speiseröhre, Magen, Darm). Ebenfalls waren bei allen Tieren die Harnwege (Niere, Nierenbecken, Ureter, Blasenschleimhaut, Urethra) gefärbt. Weiter waren regelmässig gefärbt die Haut, die Subcutis, Fascien und Knorpel, vor allem aber die Ohren und die Conjunctiven. Die Injektionsstelle bei subcutaner, das Peritoneum bei intraperitonealer Injektion waren besonders stark gefärbt. Ferner waren gefärbt Milz, Gallenblase, Peritoneum.

Schliesslich war überall eine Färbung der Leber, der Niere, der Nebennieren und des Plexus chorioideus nachweisbar. Venen und Arterien sind ebenfalls stets gefärbt gewesen. In einigen Fällen haben wir in der Peritonealhöhle Exudat gefunden, das immer intensiv gefärbt war.

Nicht gefärbt auch bei Injektion maximaler Mengen der Farblösung blieben die Hirnsubstanz, die Cerebrospinalflüssigkeit, das Blut und mit Ausnahme eines Versuches (intraperitoneale In-

jektion) die Lungen und Pleura. Nur bei intensiver Färbung und bei der intravenösen Injektion färbte sich die quergestreifte Muskulatur, das Pericard und Endokard, Thymus und Pancreas. Die Geschlechtsorgane waren ebenfalls nur bei starker Färbung und auch in diesen Versuchen nie intensiv blau.

Die Intensität der Färbung ist in den einzelnen Organen nicht überall die gleiche. Am auffallendsten ist das bei der Niere der Fall. Dort ist die Rinde stets intensiv blau, während das Mark nur einen schwach bläulichen Ton annimmt. Wieder stärker sind gefärbt Nierenbecken und Ureter, etwas heller die Blasenschleimhaut. Die mikroskopischen Schnitte, die wir von unseren Nierenpräparaten machten, entsprechen im Grossen und Ganzen den Befunden von *Goldmann*. Das Verhalten der Nebenniere ist stets so, dass die Rinde blauer als das Mark war. Auffallend ist, dass in dem Gastrointestinaltractus stets die stärkste Färbung bei den Lippen und Zunge und in der Pylorusgegend des Magens zu finden war. Die Pylorusgegend als Prädilektionsstelle für diese Färbung ist sehr auffallend und doch finden wir bei *Goldmann* darüber keine Mitteilung. Die Cardiagegend ist bedeutend heller. Ein derartig prägnanter Unterschied finden wir z. B. bei der Blasenschleimhaut nicht. Hier ist die Schleimhaut scheinbar homogen gefärbt und ein Unterschied zwischen Sphinctergegend und den andern Partien ist nicht zu sehen.

Die Galle in der Gallenblase enthielt bei sämtlichen Tieren blauen Farbstoff und besonders bei hohen injizierten Dosen war die Galle intensiv gefärbt. Mageninhalt wies niemals eine Spur von Färbung auf und Darminhalt war nur bei Hochtreibung der Färbung mit intravenöser Injektion leicht gefärbt. Ueber das Verhalten des Harns siehe später.

Aus unseren Versuchen geht hervor, dass die intensive Färbung, wie es übrigens vorauszusehen war, nach intravenöser Injektion geschieht. Bei diesem Injektionsmodus werden die Organe innerhalb weniger Stunden gefärbt (Mundschleimhaut, Conjunctiven, Ohren, Harn). Bei intraperitonealer und subcutaner Injektion braucht es meist einige Tage, bis eine Färbung des Körpers eintritt. Auch war es nötig, eine grössere Menge des Farbstoffes zu injizieren, bis der Beginn der Färbung nachweisbar war. Bei subcutaner Injektion waren 0,2 — 0,3 gr. des Farbstoffes nötig,

bis der Körper der Tiere eine Färbung aufwies, bei intraperitonealer 0,10 — 0,15 und bei intravenöser 0,05 und noch weniger.

Bemerkenswert scheint uns die Tatsache, dass eine Färbung der Lunge in unseren Versuchen ausschliesslich nach intraperitonealer Injektion auftrat. Auch in diesem Falle war die Lunge mehr leicht blau gefärbt. *Goldmann* berichtet über eigentümliche Korrelationen zwischen der Leber und der Lunge. Bei einem seiner Versuche mit Pyrrolblau bei einer Ratte war die Lunge tiefblau gefärbt, während die Leber auffallend hell blieb. Wir können Goldmann insofern bestätigen, als bei unserem Tiere mit gefärbter Lunge die Leber bedeutend weniger gefärbt war als bei allen unsern übrigen Versuchstieren.

Goldmann ist der Ansicht, dass unter gewissen Bedingungen „bestimmte Zellen in der Lunge ein starkes Attraktionszentrum für die blauen Farbstoffe zum Nachteil für die Sternzellen der Leber bilden". (*Goldmann*, über „vitale Färbung", Bruns Beiträge zur klinischen Chirurgie 64, 1909 S. 212.)

Wir sind sehr wenig orientiert über die Wechselbeziehungen in der Tätigkeit der einzelnen Organe; es besteht aber gar kein Zweifel, dass derartige Beziehungen zwischen der Leber und der Lungentätigkeit in ausgedehntem Masse vorhanden ist.

In zwei, allerdings mehr nebensächlichen Punkten stimmen unsere Resultate mit denjenigen von *Goldmann* nicht überein. *Goldmann* behauptet, dass die Färbung der Leber früher auftritt als diejenige der Niere. Wir fanden im Gegenteil stets, dass z. B. bei schwacher Färbung die Nierenrinde gefärbt war, während makroskopisch die Leber kaum eine Färbung aufwies. *Goldmann* behauptet ferner, dass mit der Steigerung der Farbstoffmenge eine Steigerung in der Färbung des Nierenparenchyms nicht erfolgt. Hierin weicht die Niere grundsätzlich von der Leber und besonders von der Nebenniere ab: „Ich habe vielmehr den Eindruck, dass nach der ersten Injektion die Nierenfärbung am intensivsten ist, nach weiteren kann sie allmählich ablassen und fast ganz verschwinden, während die übrigen Organe Anhäufung des Farbstoffes immer mehr und mehr zunimmt" (*Goldmann*, Über vitale Färbung, Bruns Beiträge zur klinischen Chirurgie 64. 1909 S. 215.)

Bei unseren Versuchen war das durchaus nicht der Fall. Mit jeder Injektion wurde die Niere mehr und mehr gefärbt, so

dass bei allen Tieren die Niere in Vergleich mit den andern Organen stets am stärksten gefärbt war und niemals eine Ablassung aufwies.

Die Art der Zusammensetzung der Nahrung scheint auf die Färbung der Organe und des Harns einen deutlichen Einfluss auszuüben. Wie aus der beigelegten Tabelle ersichtlich ist, waren die „Rübentiere" durchwegs weniger gefärbt als diejenigen, welche Kleiefütterung bekamen. Die Unterschiede werden am deutlichsten bei den Tieren, welche den Farbstoff subcutan oder intraperitoneal erhielten. Wir haben diese Differenz in der Farbintensität hauptsächlich für die Niere, Leber und Magendarmkanal beobachtet. Das gleiche Verhalten wies der Harn auf. Das Versuchstier IV, welches 0,375 gr des Farbstoffes erhielt, hatte einen sehr intensiv blauen Harn, das Tier I, welches 0,5 gr einer ebenfalls 0,5 % Lösung subcutan erhielt, schied einen Harn aus, der nur Spuren des Farbstoffes enthielt. Man könnte allerdings einwenden, dass die Harnmenge der „Rübentiere" stets reichlicher war als diejenige der „Kleietiere"; wir können jedoch mit Bestimmtheit behaupten dass die Menge des Farbstoffes, die von den letzteren ausgeschieden wurde, auch absolut viel grösser war als diejenige, die im Harne der „Rübentiere" vorhanden war. Bei intravenöser Injektion war dieser Unterschied auch vorhanden, jedoch in bedeutend kleinerem Masse als nach subcutaner oder intraperitonealer Injektion.

Die Ursache des Einflusses der Nahrung auf die Färbung der Organe und des Harns lässt sich nicht mit Sicherheit angeben.

Die Kleie wurde stets mit Wasser vermengt gefüttert, ausserdem stand dem Kaninchen stets Wasser zur Verfügung. Den Rübentieren wurde kein Wasser gegeben, immerhin können wir annehmen, dass die letzteren wegen des hohen Wassergehaltes der Rüben mehr Wasser bekamen als die Kleietiere, daher auch die kleinere Harnmenge der Kleietiere. Der Wassergehalt der Rüben ist aber sicher nicht eine genügende Ursache der Unterschiede in der Färbung zwischen den Kleie- und Rübentieren. Wenn wir die Zusammenstellung der Kost betrachten, so fällt es auf, dass die Rüben keine Spuren Fett enthalten, während die Kleien in ihrer Trockensubstanz 2—5,5 % enthalten. Die Rübe ist auch eiweissärmer (7—9 % in der Trockensubstanz) als die Kleie (16—30 %). Die Vermutung ist naheliegend, dass der Fett-

gehalt der Kleie beziehungsweise der Fettmangel der Rübe bei der Vitalfärbung ausschlaggebend ist.

Was das Verhalten des Harns anbelangt, so können wir eine Beobachtung von *Goldmann* nicht bestätigen, nämlich, dass die Färbung des Urins bei wiederholten Injektionen nach der ersten Injektion am intensivsten sei, um dann successive abzunehmen. Die Ursache dieser Differenz liegt vielleicht darin, dass *Goldmann* fast ausschliesslich mit Mäusen experimentierte, während wir Kaninchen als Versuchstiere gewählt haben.

Der Farbstoff findet sich im Harne nicht immer gelöst, sondern zum Teil gelöst, zum Teil in feinen Körnchen. Wird der Harn in Toluol aufbewahrt, so bildet sich bei starkgefärbtem Harn ein Niederschlag, der den grössten Teil, bisweilen die gesamte Menge des Farbstoffes mit sich reisst. Das Filtrat bei einem solchen Harne ist dann gelb und zeigt keine Spur mehr von einer blauen Färbung.

Was die Untersuchungen mit Phloridzin anbelangt, so können wir uns wie folgt zusammenfassen:

Wir behandelten zwei Tiere mit Phloridzin und Trypanblau zur gleichen Zeit. Gegenüber den Kontrolltieren, die die gleiche Fütterung und die gleiche Dosis des Farbstoffes erhielten, zeichneten sich die Phloridzintiere dadurch aus, dass bei ihnen der Harn fast kein Farbstoff enthielt und dass die Leber und die Nierenrinde deutlich weniger gefärbt waren als bei Kontrolltieren. Diese Farbstoffdifferenz war bei den übrigen Organen makroskopisch nicht erkennbar.

Unsere Untersuchungen deuten darauf hin, dass sowohl Leber als auch die Niere von Phloridzin beeinflusst werden.

Schlusssätze.

In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Male über die Versuche berichtet über den Einfluss der Nahrung auf die Vitalfärbung bei Tieren.

Kaninchen, die mit Kleie gefüttert werden, erzeugen nach Injektion von Trypanblau (subcutan, intraperitoneal, intravenös) einen Harn, der bedeutend weniger Farbstoff enthält als die Kaninchen, die mit Rüben gefüttert werden.

Die Harnwege und die Leber sind bei den Rübentieren, namentlich bei subcutaner oder intraperitonealer Injektion von Trypanblau, weniger gefärbt als die der Kontrolltiere mit Kleiefütterung. Die Färbung der Organe ist aber unabhängig in Bezug auf die Lokalisation des Farbstoffes von dem Injektionsmodus, mit Ausnahme bei der intraperitonealen Injektion (Färbung der Lunge. Versuch No. V bei intraperitonealer Injektion).

Phloridzindiabetische Kaninchen erzeugen einen Harn, der nur Spuren von Farbstoff aufweist. Leber und Niere der Phloridzintiere sind weniger gefärbt als diejenigen der gleichbehandelten d. h. gleich gefütterten Kontrolltiere.

Als gemeinsame Resultate unserer Vitalfärbungsversuche möchten wir folgende besonders hervorheben.

a) eine 0,5—1 % frisch bereitete Lösung von Farbstoff in destilliertem Wasser wird von Kaninchen auch in grossen Dosen (täglich 20 ccm. einer 1 % Lösung vier Tage hintereinander) intravenös ohne sichtbare Schädigung des Tieres stets gut vertragen;

b) bemerkenswert ist, dass stets die Pars pylorica des Magens viel intensiver gefärbt war als die übrige Magenschleimhaut;

c) die Galle enthielt bei sämtlichen Tieren mehr oder weniger reichlich blauen Farbstoff;

d) die Wand der Blutgefässe (Arterien, Venen) ist bei unseren Versuchen immer gefärbt gewesen.

Versuchs-nummero	Gewicht des Tieres	Art der Fütterung	Farbstoff		Gefärbt		Harn		
			Menge	Injiziert	Leber	Niere (Rinde)	Menge	Gefärbt nach	Intensität
1.	2330 gr.	Rüben	0,50 gr.	subcutan	stark	stark	ca. 300 ccm täglich	0,30 gr.	spur-weise
2.	2650 gr.	Rüben	0,55 gr.	subcutan	sehr stark	stark	ca. 350	0,35 gr.	ge-färbt
3.	2250 gr.	Kleie	0,30 gr.	subcutan	sehr stark	sehr stark	ca. 100	0,2 gr.	ge-färbt
4.	2900 gr.	Kleie	0,375 gr.	subcutan	sehr stark	sehr stark	ca. 150	0,2 gr.	sehr stark
5.	2230 gr.	Rüben	0,20 gr.	intraperi-toneal	wenig	stark	ca. 250	0,15 gr.	spur-weise
6.	2500 gr.	Kleie	0,20 gr.	intraperi-toneal	sehr stark	sehr stark	ca. 100	0,15 gr.	sehr stark
7.	1850 gr.	Rüben	0,20 gr.	intravenös	stark	stark	ca. 250	0,05 gr.	stark
8.	2600 gr.	Rüben	0,80 gr.	intravenös	sehr stark	sehr stark	ca. 200	gleich nach der ersten Injection	sehr stark
9.	1300 gr.	Kleie	0,10 gr.	intravenös	stark	stark	ca. 80	0,05 gr.	stark
10.	2400 gr.	Kleie	0,30 gr.	intravenös	sehr stark	sehr stark	ca. 20	gleich nach der ersten Injection	sehr stark
11.	2250 gr.	Kleie	0,80 gr.	intravenös	sehr stark (mehr als bei X)	sehr stark (mehr als bei X)	ca. 80	gleich nach der ersten Injection	sehr stark
12.	1700 gr.	Heu	0,15 gr.	intravenös	stark	stark	ca. 100	gleich nach der ersten Injection	stark
13.	1500 gr.	Heu und Phloridzin	0,15 gr.	intravenös	stark	weniger als bei XII	ca. 100	—	kaum gefärbt
14.	2250 gr.	Kleie	0,60 gr.	intravenös	sehr stark	sehr stark	ca. 150	gleich nach der ersten Injection	stark
15.	2200 gr.	Kleie u. Phlorid-zin	0,60 gr.	intravenös	weniger stark als bei XIV		ca. 150	gleich nach der ersten Injection	etwas ge-färbt

Literatur-Verzeichnis:

1. *Arnold:* Ueber Granulafärbung lebender und überlebender Leukocyten. Virchow's Archiv für pathologische Anatomie. Bd. 157, Seite 424. 1899.

2. *Derselbe:* Weitere Beobachtungen über vitale Granulafärbung. Anatomischer Anzeiger. Bd. 16. 1899.

3. *Derselbe:* Ueber „vitale" Granulafärbung in den Knorpelzellen, Muskelfasern und Ganglienzellen. Archiv für mikroskopische Anatomie. Bd. 55, Seite 479. 1900.

4. *Aschoff u. Kiyono:* Zur Frage der grossen Mononukleären. Folia hæmatologica. Bd. 15, Heft 3, Seite 383. 1913. Archiv.

5. *Bouffard:* Injection des couleurs de Benzidine aux animaux normaux. Annales de l'Institut Pasteur T. XX. N. 7. Seite 539. 1906.

6. *Ehrlich:* Ueber den jetzigen Stand der Chemotherapie. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. Bd. 42, Heft 1, Seite 17. 1909.

7. *Derselbe:* Zur biologischen Verwertung des Methylenblau. Biologisches Centralblatt. Bd. 7, Seite 214. 1886.

8. *Derselbe:* Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus, eine farbenanalytische Studie. Berlin. 1885.

9 *Evans, Schulemann u. Willborn:* Die vitale Färbung mit sauren Farbstoffen in ihrer Bedeutung für pharmakologische Probleme. Deutsche medizinische Wochenschrift No. 30. 1914.

10. *Galeoti:* Ricerche sulla colorabilità delle cellule viventi. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie. Bd. 11, Seite 172—204. 1894.

11. *Goldmann:* Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. Bruns Beiträge zur klinischen Chirurgie. Bd. 64, Seite 192. 1909 und Bd. 78, Seite 1. 1912.

12. *Derselbe:* Vitale Färbung und Chemotherapie. Berliner klinische Wochenschrift No. 36. 1912.

13. *Gross:* Experimentelle Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen histologischen Veränderungen und Funktionsstörungen der Nieren. Ziegler. Beiträge zur pathologischen Anatomie. Bd. 51, Seite 528. 1911.

14. *Heidenhain:* Ueber chemische Umsetzungen zwischen Eiweisskörpern und Anilinfarben. Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie. Bd. 9. 1875.

15. *Hörber und Königsberg:* Farbstoffausscheidung durch die Nieren. Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie. Bd. 108, Heft 6-7, Seite 323. 1905.

16. *Kiyono:* Zur Frage der histiocytären Blutzellen. Folia hæmatologica Bd. 18 Heft 3, Seite 149. 1914.

17. *Derselbe:* Vitale Karminspeicherung. Jena 1914.

18. *Læle:* Ueber vitale Granulafärbung mit sauren Farbstoffen. Folia hæmatologica. Bd. 14, Heft 3, Seite 308. 1912 Archiv.

19. *Mayer:* Die Methode der Methylenblaufärbung. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie. Bd. 6, Seite 422. 1887.

20. *Metzner:* Die Absonderung und Herausbeförderung des Harns. Nagel's Handbuch der Physiologie des Menschen. Bd. 2. 1906.

21. *Michaelis:* Die vitale Färbung, eine Darstellungsmethode der Zellgranula. Archiv für mikroskopische Anatomie. Bd. 55, Seite 558. 1900.

22. *Möllendorf:* Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen und ihre Abhängigkeit vom Lösungszustand des Farbstoffes. Deutsche medizinische Wochenschrift No. 41, Seite 1839. 1914.

23. *Nicolle et Mesnil:* Traitement des Trypanosomiases par les couleurs de Benzidine première Partie: Étude chimique. Annales de l'Institut Pasteur T. XX. No. 6, page 418; seconde Partie: Étude expérimentale. Annales de l'Institut Pasteur T. XX. No. 7, page 513.

24. *Overton:* Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle. Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik. Bd. 34, Heft 4.

25. *Pappenheim und Nakano:* Beiträge über Beziehung zwischen Vitalfärbung, Supravitalfärbung und Oxydaserelation. Folia hæmatologica. Bd. 14, Heft 3, Seite 260. 1912 Archiv.

26. *Pari:* Ueber die Verwendbarkeit vitaler Karmineinspritzungen für die pathologische Anatomie. Frankfurter Zeitschrift für Pathologie. Bd. 4. 1910.

27. *Plato:* Ueber die „vitale" Färbbarkeit der Phagocyten des Menschen und einiger Säugetiere mit Neutralrot. Archiv für mikroskopische Anatomie. Bd. 56, Seite 868. 1910.

28. *Ribbert:* Die Abscheidung intravenös injizierten gelösten Karmins in den Geweben. Verworns Zeitschrift für allgemeine Physiologie. Bd. 4, Seite 201. 1904.

29. *Ruzicka:* Zur Frage der Färbbarkeit der lebenden Substanz. Verworns Zeitschrift für allgemeine Physiologie. Bd. 4, Seite 141. 1904.

30. *Schlecht:* Experimentelle Untersuchungen über die Resorption und die Ausscheidung des Lithionkarmins unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Ziegler's Beiträge zur pathologischen Anatomie. Bd. 40, Seite 312. 1907.

31. *Schulemann:* Die vitale Färbung mit sauren Farbstoffen in ihrer Bedeutung für Anatomie, Physiologie, Pathologie und Pharmakologie. Biochemische Zeitschrift. Bd. 80. 1917.

32. *Derselbe:* Vitalfärbung und Chemotherapie. Berliner klinische Wochenschrift No. 11. 1912.

33. *Derselbe:* Beiträge zur Vitalfärbung. Archiv für mikroskopische Anatomie. Bd. 79, Heft 2, Seite 223. 1912.

34. *Derselbe:* Ueber Natur und Genese der durch saure Farbstoffe entstehenden Vitalfärbungsgranula. Folia hæmatologica. Bd. XIX, Heft 2, Seite 207. 1915 Archiv.

35. *Steudemann:* Phagozytose in der Milz. Folia hæmatologica. Bd. 18, Heft 2, Seite 140. 1914 Archiv.

36. *Tschaschin:* Ueber die „ruhenden" Wanderzellen und ihre Beziehungen zu den anderen Zellformen des Bindegewebes und zu den Lymphocyten. Folia hæmatologica. Bd. 17, Heft 3, Seite 317. 1913 Archiv.

37. *Derselbe:* Ueber vitale Färbung der Chondriosomen in Bindegewebszellen mit Pyrrolblau. Folia hæmatologica. 1912. Bd. 14, Heft 3, Seite 295. Archiv.